

OTKA záró beszámoló 72730

Magreceptorok genomszintű vizsgálata..

Témavezető: Nagy László

A pályázat során megvalósított kísérleti munkánk célja egyes magreceptorok genomi aktivitásának vizsgálata teljes genom vizsgálatokkal (microarray, ChIP seq, GRO seq) immunsejtekben: dendritikus sejtekben és makrofágokban. Ennek során először meghatároztuk az adott magreceptor által szabályozott transzkripteket tipikusan mikroarray módszerekkel, majd funkcionális vizsgálatokkal meghatároztuk a szabályozott génhálózatok biológiai, immunológiai funkcióját. Ezzel a stratégiával kimerítően jellemeztük a humán eredetű monocitából származó dendritikus sejteket. A pályázat második részében a nemzetközi trendeket is figyelembe véve érdeklődésünk részben a genetikai modellként is jól használható egér modellek irányába is fordult. Ebben a beszámolóban közölt eredményeinket a közleményre való utalással csak röviden foglaljuk össze, a meg nem közölt eredményeinket részletesen kifejthetjük.

Közölt eredmények:

1. 1,25-dihydroxyvitaminD3 is an autonomous regulator of the transcriptional changes leading to a tolerogenic dendritic cell phenotype

Széles, L., Keresztes, G., Töröcsik, D., Balajthy, Z., Krenács, L., Pólska, S., Steinmeyer, A., Zuegel, A., Pruenster, M., Rot, A. and **Nagy, L.**

Journal of Immunology 182(4):2074-2083 (2009) IF: 5,646

Feltérképeztük a D vitamin receptor (VDR) genomi hatásait humán monocita eredetű dendritikus sejtekben mikroarray kísérletek segítségével. Megállapítottuk, hogy a receptor aktiválása legalább 3 féle transzkripció mechanizmuson keresztül szabályozza a dendritikus sejtek differenciálódását és ezáltal járul a tolerogén dendritikus sejtek kialakulásához. Azonosítottunk számos potenciális célgént is, ami a tolerogén fenotípushoz vezethet.

2. Activation of LXR sensitizes human dendritic cells to inflammatory stimuli

Töröcsik, D., Baráth, M., Benkő, S., Széles, L., Dezső, B., Pólska, S., Hegyi, Z., Homolya, L., Szatmári, I., Lányi A., and **Nagy, L.**

Journal of Immunology 184:5456-5465 (2010) IF: 5,746

Megállapítottuk, hogy az LXR receptor aktiválása elősegíti a dendritikus sejtek immunválaszát az NFkB útvonal bizonyos tagjainak stabilizálásával. Meghatároztuk azokat a sejtes immunfunkciókat, melyek változnak a receptor aktiválásának hatására. Megállapítottuk azt is, hogy pozitív feed forward mechanizmus létezik az LXR receptor és az NFkB útvonal között.

3. Transcriptome profiling of genes regulated by RXR and its permissive and nonpermissive partners in differentiating monocyte-derived dendritic cells

Szeles, L., Poliska, S., Nagy, G., Szatmari, I., Szanto, A., Pap, A., Lindstedt, M., Santegoets, S., Ruehl, R., Dezso, B. and **Nagy, L.**

Azt követően, hogy szisztematikusan és kimerítően meghatároztuk a human monocitából származó dendritikus sejtekben előforduló RXR heterodimerek aktiválásának biológiai hatását ebben a munkánkban azt vizsgáltuk meg, hogy az RXR receptor aktiválása milyen génexpressziós változásokat indukál. Megállapítottuk, hogy a permisszivitás, nem permisszivitás szabálya nem általános érvényű hanem a sejtkontextustól és a szabályozott géntől is függ.

4. STAT6 transcription factor is a facilitator of the nuclear receptor PPAR γ -regulated gene expression in macrophages and dendritic cells

Szanto, A., Balint L. B., , Nagy, Z., Barta, E., Dezso, B., Pap, A., Szeles, L., Poliska, S., Oros, M., Evans, R.M., Barak, Y., Schwabe, J. and **Nagy, L.**

Immunity 33: 699-712 (2010) IF: 24,221

Megállapítottuk és jellemeztük a STAT6 transzkripciós faktor és a PPAR γ magreceptor közötti transzkripciós együttműködés jelenségét és a kölcsönhatás jellegét. Megállapítottuk, hogy a STAT6 transzkripciós faktor ún. úttörő faktorként működik a PPAR γ szignál kialakítása során és fokozza mind a regulált gének számát, mind az indukciók nagyságát.

5. PPAR γ -regulated Cathepsin D is required for lipid antigen presentation by dendritic cells

Nakken, B., Varga, T., Szatmari, I., Szeles, L., Gyongyosi, A., Illarionov, P., Dezso, B., Gogolak, P., Rajnavolgyi, E. and **Nagy, L.**

Journal of Immunology 187:240-247 (2011) IF: 5,788

A PPAR γ -RAR szabályozási tengely egy új tagját azonosítottuk a CathepsinD nevű fehérjét, ami a lipid antigén prezentáció lyzoszomális lépéseit katalizálja a Saponinok elhasítása révén.

6. Live cell fluorescence correlation spectroscopy dissects the role of coregulator exchange and chromatin binding in retinoic acid receptor (RAR) mobility

Brazda, P., Szekeres, T., Bravics, B., Tóth, K., Vámosi, G., and **Nagy, L.**

Journal of Cell Science 124(21) 3631-3642 (2011) IF: 6,111

Biofizikai módszerekkel jellemeztük a retinsav receptor diffúzióját egyedi sejtek vizsgálata során. Az alkalmazott módszer Fluoreszcens Korrelációs Spektroszkópia (FCS) megmutatta, hogy a receptor két különböző diffúziós állapotban található, amelynek sejttagon belüli aránya a ligand hatására változik és amit elsősorban a kofaktor kötés határoz meg.

Még nem közölt eredmények:

1. RXR cisztrome (genomi kötőhelyek összessége) és genomi kölcsönhatások meghatározása egér csontvelő eredetű makrofágokban.

Ezen vizsgálataink középpontjában az RXR (Retinoid X receptor) magreceptor áll. Az RXR kritikus szerepet játszik a magreceptorok által szabályozott génexpresszióban, ugyanis egy általános heterodimerizáló partnerként, más receptorok működését is befolyásolja. A magreceptorok harmadával heterodimert alkothat, így különösen érdekes az, hogy a teljes genom szintjén milyen kötődési mintázatot mutathat a receptor.

Munkánk fő célja a ChIP-seq (Chromatin immunoprecipitation followed by sequencing) metodika beállítása és primer immunsejtekben különböző magreceptorok, kofaktorok és epigenetikai módosítások vizsgálata volt.

A módszer első lépése a DNS-fehérje komplexek rögzítése, amelyet a teljes genom feldarabolása, majd a specifikus antitesttel való immunprecipitáció követ. Az antitesttel történő elválasztás után a DNS-fehérje kapcsolatokat megszüntetjük, így a folyamat végén megkapjuk a vizsgált fehérje által kötött genom darabokat. Ezeket a DNS szakaszokat új generációs szekvenálással azonosítjuk, majd a referencia genomot felhasználva meghatározzuk azok pontos elhelyezkedését.

Kísérleteinkhez egér csontvelői eredetű makrofágokat használtunk (BMDM, Bone marrow derived macrophages). A sejteket izolálás után 5 napig differenciáltattuk MCSF (Monocyte colony-stimulation factor) segítségével. Ezután a sejteket egy szelektív RXR agonistával, LG268-al kezeltük. A kezelés után ChIP segítségével DNS-t izoláltunk, majd elkészítettük a könyvtárakat a szekvenáláshoz. A kísérleteinkhez több antitestet is használtunk. Ezek mind olyan fehérjéket, epigenetikai módosításokat detektálnak, amelyek fontos információkat adhatnak az adott régió génexpressziós állapotáról.

Vizsgálatainkhoz az alábbi antitesteket használtuk:

Fehérje/Antitest neve	Leírás	Gyártó
RXR (Retinoid X receptor)	Ligand által szabályozható transzkripciós faktor. Általános heterodimerizáló partnere a magreceptorok harmadának.	Santa Cruz (sc-774)
P300 (Histone acetyl transferase p300)	Hisztón acetiltranszferáz aktivitással rendelkező kofaktor.	Santa Cruz (sc-585)
HDAC3 (Histone deacetylase 3)	Hisztón deacetiláz aktivitással rendelkező kofaktor.	Abcam (ab7030)
Med12 (Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 12)	Az alap transzkripciós apparátusban elhelyezkedő mediátor komplex tagja. Valószínűleg szerepet játszik a több kilobázis távolságban lévő cisz-elemek és promóterek kölcsönhatásának szabályozásában.	Bethyl laboratories (a300 774a)
PU.1 (Transcription factor PU.1)	Transzkripciós faktor, amely valószínűleg a makrofág, b-sejt differenciációban tölt be fontos szerepet.	Santa Cruz (sc-352)
CTCF (CCCTC-binding factor)	Inzulátor faktor, amely képes a kromatin hurkok képződését irányítani.	Millipore (07-729)
H3K4me3 (Histone modification)	Olyan hisztón módosítás, amely az aktív gének transzkripciós startpontját élesen megjelöli.	Abcam (ab8580)
H3K4me2 (Histone modification)	Olyan hisztón módosítás, amely az aktív gének 5' végét jelöli meg.	Upstate (07-030)
H4ac (Histone modification)	Aktív géneket és azok enhanszereit megjelölő hisztón módosítás.	Millipore (06-866)
H3K27ac (Histone modification)	Aktív géneket és azok enhanszereit megjelölő hisztón módosítás.	Abcam (ab4729)

Eredményeink alapján elmondható, hogy kísérleti rendszerünkben a makrofág genomban hozzávetőleg 6000 RXR kötő hely található alapállapotban. Ezeken a régiókon az RXR génexpresszióra kifejtett hatása az ott jelenlévő kofaktorok, epigenetikai módosítások kontextusában értelmezhető. Az RXR kötőhelyek jelentős része enhanszereken detektálható a gének promóterétől általában 5' irányban. Több esetben azonban intronikus kötőhelyeken is megfigyelhető a receptor elhelyezkedése. Az aktív és szabályozott gének transzkripció startpontján ritka az RXR kötés, azonban a jól ismert H3K4me3 módosítás erősen megjelenik, a H3K4me2, H4ac, H3K27ac-val együttesen. A metilációs módosításokkal szemben a hiszton acetilációs markerek nemcsak a start pontokon helyezkednek el, hanem a génekhez tartozó enhanszereken is. Ligand kezelés hatására az RXR által elfoglalt régiók majdnem 50%-án indukálódik a megreceptor kötődése. Új kötőhelyek ritkán alakulnak ki és nagyobb mértékű reorganizáció sem figyelhető meg. A különböző kofaktorok (p300, HDAC3, Med12) gyakran egy komplexben vannak jelen a magreceptorral. Ligand hatására az RXR-al egy komplexben lévő p300 kofaktor szintje jelentősen megnő, amit az HDAC3 leválása követhet. Azonban a teljes genom szintjén inkább a két fehérje együttes megjelenése jellemző az RXR-al egy pontban. A Med12 a mediátor komplex tagjaként leírt fehérje, amely általában kapcsolódik ezekhez a komplexekhez, azonban legtöbbször csak a potenciálisan szabályozott géntől távol elhelyezkedő enhanszereken. A Med12 kötőhelyek ritkán indukálódnak ligand hatására, azonban jelenlétük, irodalmi adatok alapján lehetőséget teremthet a promóter és enhanszer kapcsolatok létrejöttének. A vártak megfelelően a hisztonok acetilációja a ligand kezelés hatására megnövekszik azokon a régiókon, ahol az RXR/p300 komplexek létrejöttek. A ligand kezelés hatására azonban a hisztonok metilációs módosításának szintje nem változik. Várakozásainknak megfelelően a makrofág genomban a legtöbb helyre a PU.1 transzkripció faktor kötődik (~40000 genomi kötőhelyet azonosítottunk). A PU.1 kötőhelyek átfedhetnek az RXR által elfoglalt régiókkal és ligand hatására az RXR kötésével ellentétesen változhat a szintjük. Eredményeink tehát megerősítik azt az elképzelést, mely szerint a PU.1 egyfajta „mester” faktorként a makrofág genom bizonyos részét kötve a kromatint inkább eukromatikus állapotban tartja és biztosítja más transzkripció faktorok számára a kötőhelyek könnyű hozzáférhetőségét. Az inzultorként ismert CTCF makrofágokban körülbelül 20000 helyre kötődik. A teljes genom szintjén a kísérleti rendszerünkben a CTCF kötőhelyek nem fednek át más komplexekkel. Ligand hatására gyakorlatilag alig változik a kötőhelyek erőssége és a száma. Elmondható tehát, hogy a CTCF a makrofág genomban is hasonló funkciókkal rendelkezhet, mint az eddig leírt sejt típusokban, tehát irányíthatja a promóter és más cisz elemek kölcsönhatását és a különböző módon szabályozott transzkripció egységeket különíti el egymástól.

Összefoglalásként elmondható, hogy sikeresen beállítottuk a ChIP-seq kísérleteket egér csontvelői eredetű makrofágokon. Ennek a módszernek köszönhetően jelentős információkat kaptunk az RXR által szabályozott genomi régiókról. ChIP-seq adataink segítségével meghatároztunk több 100 olyan genomi régiót, amelyek nagy valószínűséggel az RXR és partnerei által szabályozottak. Céljaink közé tartozik, hogy más, teljes genom szintű vizsgálatokkal meghatározzuk az RXR által regulált gének naszcens és érett mRNS szintjét (GRO-seq, Global Run-On sequencing, RNA-seq) és az adatainkat átfedésbe hozzuk a ChIP-seq eredményekkel. Ezekkel a módszerekkel a jövőben meghatározzuk a teljes RXR cisztromot makrofágokban, amely hozzásegíthet minket a magreceptorok teljes genom szintű működésének megértéséhez.

2. Epigenetikus módosítások (hiszton acetiláció és metiláció) valamint transzkripció faktorok kromatin immunprecipitációjának (a továbbiakban ChIP) optimalizálása primer humán monocita eredetű makrofágokban

A humán primer makrofágokban citokinek, pl IL-4 hatására bekövetkező hisztonmódosítások valamint az IL-4 hatására aktiválódó STAT6 transzkripciós faktor genomszintű kötőhelyeinek feltérképezése érdekében a primer egér makrofágokban már sikeresen használt ChIP módszerét módosítanunk kellett. A humán monocita eredetű makrofágok ugyanis csak gyengén tapadnak a tenyésztőedényhez, így az egér makrofágokkal szemben a sejtekkel szuszpenziós állapotban dolgoztunk. A CD14+, buffy coat-ból izolált monocitákat 24 órán keresztül tenyésztőflaskában differenciáltattuk, majd vagy oldószer (ctrl) vagy RSG (1 μ M) és harminc perc elteltével IL-4 kezelésnek vetettük alá (RSG/IL-4). A ChIP-hoz a sejteket további harminc perc elteltével szüreteltük le, míg a sejtek tíz százalékát összesen három és fél órán keresztül tartottuk a RSG/IL-4 koktél jelenlétében, hogy a PPAR γ target gén, az FABP4 és az IL-4 target gén CCL26 expressziós szintjének ellenőrzésével a kezelések eredményességéről meggyőződhesünk. A ChIP-hoz a sejteket úgynevezett dupla fixálásnak vetettük alá. Ennek során a hagyományosan használt formaldehides fixálást megelőzően, amely a DNS és fehérjék között hoz létre kovalens keresztkötéseket, Di(N-succinimidil)-glutaráttal (DSG) történő fixálással hosszabb „karú” fehérje-fehérje keresztkötéseket is létrehozunk, amellyel a transzkripciós faktorok ChIP-jának hatékonyságát fokozhatjuk [1]. A TF-ok ugyanis nagyméretű fehérjekomplexek tagjaiként sokkal érzékenyebbek a DNS feldarabolásához használt szonikálásra, még a legkontrolláltabb körülmények között is könnyen szétesnek, ezért szükséges a kettős keresztkötés. A ChIP egyik legsarkalatosabb lépése a szonikálás, ennek erősségét és időtartamát minden sejtípus és minden szonikátor esetében empirikusan kell megállapítani. A következő lépésben optimalizáltuk a DNS fragmentálását a rendelkezésünkre álló DiaGenode vízhűtéses és úgynevezett vízbemerülő szonikátorral és meghatároztuk a ChIP-Seq módszerhez elengedhetetlenül fontos 3-500 bp hosszúságú fragmentméret eléréséhez szükséges paramétereket. A hisztonmódosítások közül az acetilált hiszton 4 és a K27-en trimetilált hiszton 3 az aktív transzkripció helyeit jelöli. Ezen poszttranszlációs módosítások ellen termeltetett, valamint STAT6 ellenes antitesttel végeztünk ChIP-öt a ctrl vagy RSG/IL-4 kezelt sejtekből készített kromatinból. A ChIP eredményességéről a STAT6 ismert targetjének, a saját aktivitását negatívan szabályozó SOCS1 génnek a promóterében található, STAT6 kötőhelyet tartalmazó DNS szakasz [2] feldúsulásának mérésével győződünk meg. A következőkben pedig a ChIP-val nyert, STAT6 kötőhelyeket és a fent leírtak szerint módosított hisztonok kötőhelyeit tartalmazó DNS-ből könyvtárat készítettünk. Kontrollként a kezeletlen sejtekből ugyanolyan eljárással és antitestekkel nyert DNS valamint a kezelt sejtek kromatinjából nyert fragmentált teljes genomi DNS (input) szolgált.

1. Nowak, D.E., B. Tian, and A.R. Brasier, *Two-step cross-linking method for identification of NF-kappaB gene network by chromatin immunoprecipitation*. Biotechniques, 2005. **39**(5): p. 715-25.
2. Hebenstreit, D., et al., *IL-4 and IL-13 induce SOCS-1 gene expression in A549 cells by three functional STAT6-binding motifs located upstream of the transcription initiation site*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 5901-7.